آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۷، شماره ۱، شهریور ۱۳۸۸

شناسایی گونه‌های *Colletotrichum* جدا شده از گیاهان زراعی لگومینوز در ایران

Charactrization of *Colletotrichum* species from legumes crop plants in Iran

دوستمراد ظفری* و ساره طراح همدانی
گروه گیاهپزشکی دانشگاه بوعلی سینا، همدان
(تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۸۶، تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۸۷)

چکیده

در این تحقیق از گیاهان زراعی تیره لگومینوز شامل یونجه، شبدر، لوبیا و سویا دارای علایم بیماری آنتراکنوز در مجموع ۱۴ جدایه *Colletotrichum* و یک جدایه *Glomerella* به‌دست آمد. این جدایه‌ها با کمک ویژگی‌های مورفولوژکی و توالی‌یابی نواحی ITS1، ITS2 و ژن 5.8S دی ان آ ریبوزومی مورد شناسایی قرار گرفتند. جدایه‌های *Colletotrichum* شامل گونه‌های *C. acutatum* و *C. dematium* از لوبیا، *C. destructivum* از یونجه و شبدر و *C. truncatum* از یونجه بودند. از بین این گونه‌ها، *C. acutatum* و *C. destructivum* برای فلور قارچی ایران جدید هستند. *C. dematium* روی لوبیا در ایران و *C. truncatum* روی یونجه در استان همدان برای اولین بار، از این میزبان‌ها گزارش می‌شوند. نمونه *Glomerella* به‌دست آمده از سویا *G. cingulata* شناسایی شد. سویا به عنوان میزبان جدیدی برای این گونه در ایران گزارش می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آنتراکنوز،یونجه،*Glomerella*

Abstract

In this study 14 *Colletotrichum* isolates and one *Glomerella* isolate were obtained from

* Corresponding author: zafari_d@basu.ac.ir

symptomatic legumes plant including alfalfa, clover, bean and soybean. Isolates were subjected to morphological and molecular comparisons. By using morphological features and ITS1, ITS2 and 5.8S regions of rDNA sequences. Four species of *Colletotrichum* and one species of *Glomerella* were identified comprising *C. acutatum*, *C. dematium, C. destractivum*, *C. trancatum* and *G. cingulata* (Figs. 1, 2, 3, 4 and 5). Among these species *C. acutatum* from bean and *C. destractivum* from alfalfa and clover are new for mycoflora of Iran. In addition This is the first report of *C. dematium* on bean and *G. cingulata* on soybesn in Iran as well as *C. trancatum* on alfalfa is reported for the first time in Hamedan province.

Key words: *Glomerella*, Anthracnose, Alfalfa.

مقدمه

یونجه، شبدر، لوبیا و سویا از گیاهان لگومینوز زراعی هستند که در سراسر جهان (Hymovitz, 1987) و هم‌چنین در ایران به طور وسیع کشت می‌شوند (Hassanzadeh Khalifeh Kandi, 2004). در استان همدان که بیشتر نمونه‌های جمع‌آوری شده در این بررسی از این منطقه بود، سطح زیر کشت این گیاهان به ویژه یونجه، شبدر و لوبیا بعد از غلات قابل توجه می باشد. در بین بیمارهای گیاهان زراعی متعلق به لگومینوز، آنتراکنوز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، گونه‌های *Colletotrichum* که غالباً روی گیاهان موجب بیمارهایی بنام آنتراکنوز می‌شوند، در سراسر دنیا شناخته و موجب خسارت قابل توجه در گیاهان می‌گردند (Sutton, 1992; Bailey & Jeger, 1992; Latunde-Dada, 2001). گاهی اوقات چند گونه مختلف *Colletotrichum* قادر به آلوده کردن یک میزبان واحد هستند و این موضوع باعث ایجاد خسارت‌های بسیار جدی به میزبان گیاهی می‌شود. مثلاً خسارت ناشی از گونه‌های *C. acutatum*، *C. gloeosporioides* و *C. fragariae* در توت‌فرنگی در اثر از بین رفتن تا ۸۰ درصد بوته‌ها در خزانه و آسیب رساندن به محصول در مزرعه تا ۵۰ درصد برآورد شده است (Howard *et al*., 1992). گونه‌های *Colletotrichum* به غیر از آنتراکنوز باعث مرگ گیاهچه، سوختگی و لکه برگی در گیاهان می‌شوند. در ضمن گونه‌های این جنس به صورت علف کش‌های قارچی (ولگو Velgo، بار آنتراکنوز Burr anthracnose، کلگو Collego و بیومال BioMal) فرموله شده‌اند و کاربرد موفقی در کنترل بیولوژیک علف‌های هرز داشته‌اند

(Jeffries *et al*., 1990; Waller, 1992). آنتراکنوز یکی از بیماری‌های مهم یونجه به شمار می‌رود. علائم بیماری بسیار متغیر است و از تعداد کمی ناحیه کوچک با شکل نامنظم و حاشیه تیره تا زخم‌های بزرگ فرورفته، تخم مرغی تا لوزی شکل، روی ساقه گیاهان حساس تغییر می‌کند. زخم‌های بزرگ قهوه‌ای روشن هستند. آسروول‌های سیاه رنگ روی زخم‌ها تشکیل می‌شوند. گاهی اوقات ممکن است زخم‌ها بزرگ شده، به هم پیوسته، دور تا دور ساقه را بگیرند و آن را از بین ببرند. آنتراکنوز سویا نخستین بار در سال ۱۹۱۷ در کشور کره گزارش شده، این گیاه در تمام مراحل رشدی به آنتراکنوز حساس است. علائم به طور معمول در ساقه‌ها، غلاف‌ها و دمبرگ‌های سویا به صورت بخش‌های قهوه‌ای رنگ فاقد شکل منظم ظاهر می‌شوند و ممکن است شبیه سوختگی غلاف و ساقه باشند. معمولاً در اواخر فصل، بافت‌های آلوده با اندام‌های باردهی سیاه رنگ (آسروول‌های قارچ) که موهای باریک سیاه را تولید می‌کنند، پوشیده می‌شوند (Lenné, 1992). شایع‌ترین عامل بیماریزا که با آنتراکنوز سویا ارتباط دارد، *Colletotrichum truncatum* (Schwein) Andrus & W.D. Moore است ولی گونه‌های دیگری مانند *C. destructivum* O' Gara، *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc. و *C. graminicola* (Ces.) Wilson نیز روی سویا گزارش شده‌اند. همه این گونه‌ها دامنه میزبانی وسیعی دارند و همه به استثنای *C. graminicola* در سویا بذر زادند (Zad, 1979; Lenné, 1992). تحقیقات زیادی بر اساس روش‌های مولکولی، برای روشن‌تر شدن وضعیت تاکسونومیک، شناسایی و تفکیک گونه‌های *Colletotrichum* صورت گرفته است. Mills *et al.* (1992) جدایه‌های *C. gloeosporioides* به دست آمده از آواکادو، انبه، پاپایا، موز، پرتقال، *Hevea* spp. و *Stylosanthes* spp. از سراسر دنیا را بر اساس توالی rDNA با هم مقایسه کردند. Sherrif *et al*. (1994) با استفاده از تعیین توالی نواحی ITS2 و ژن 28S از rDNA جنس *Colletotrichum* را به دو گروه ژنتیکی که شکل ظاهری متفاوتی نیز دارند، تقسیم نمودند. Sherrif *et al*. (1995) تمایز جدایه‌های *C. graminicola* به دست آمده از ذرت و جدایه‌های *C. sublineolum* از سورگوم را با استفاده از توالی ITS2 ثابت کردند. Bailey *et al*. (1996) گونه‌های *Colletotrichum* عامل آنتراکنوز تیره Malvaceae را بر اساس توالی‌های ITS2 و D2 از ژن 28S بررسی کردند و آن‌ها را در دو گونه شامل *C. gloeosporioides* روی *Gossypium* و *C. orbiculare* روی *Sida*، *Lavatera* و *Malva* قرار

دادنـــد. Latunde-Dada *et al.* (1996) بـــر اســـاس تـــوالی ناحیـــه D2 از ژن 28S و ITS2 و ریخت‌شناسی، بیان کردند که گونه‌های همی‌بیوتروفیک روی لوبیا چـشم بلبلـی را نبایـد جـزء *C. orbiculare* محسوب کرد و این جدایـه‌هـا فرمـی از *C. destructivum* محـسوب مـی‌شـوند. Johnson *et al.* (1997) از پلی‌مورفیسم rDNA همراه با ویژگی‌های ریخت‌شناختی برای شناسایی و معرفی گونه جدیدی به نام *C. nupharicola* که به نیلوفر آبی حمله می‌کند، استفاده کردند.

Moriwaki *et al.* (2002) تـوالی نـواحی ITS ژن rDNA از ۲۳۶ جدایـه شـامل ۲۵ گونـه *Colletotrichum* از ژاپن را تعیین کردند و بر اساس تـوالی ناحیـه ITS1، آن‌هـا را در ۲۰ گـروه ریبوزومی قرار دادند که این گروه‌ها با خصوصیات ظـاهری قـارچ‌هـا نیـز همـاهنگی داشـتند. جدایه‌های مختلف *C. gloeosporioides* در این تحقیق در سـه گـروه ریبـوزومی مختلـف قـرار گرفتند و از نظر شکل هم با هم تفاوت داشتند. *C. dematium*، *C. capsici* و سایر گونه‌هایی کـه اسپور خمیده داشتند (به غیر از گونه‌های بیماریزای تیره گرامینه) از نظر شکل به خـوبی قابـل تفکیک از هم نبودند، در سه گـروه ریبـوزومی متفـاوت قـرار گرفتنـد. تـوالی نـواحی ITS ژن rDNA در *C. destructivum*، *C. linicola* و *C. higginsianum* شـباهت زیـادی بـه هـم داشـت. Moriwaki *et al.* (2002) بیان کردند که این سه گونه، احتمالاً مترادف بوده و در یک گونـه قـرار می‌گیرند. Lubbe *et al.* (2004) گونه‌های *Colletotrichum* بیماریزا روی اعضای تیره پروتیاسه که گل برخی از جنس‌های آن بـه فـروش مـی‌رسـد و اهمیـت اقتـصادی دارنـد را بـا اسـتفاده از روش‌های ریخت‌شناختی و مولکولی بررسی کردند. آن‌ها در این تحقیق بر اساس خصوصیات ظـاهری و تـوالی نـواحی ITS از rDNA و بخـشی از تـوالی ژن بتـا- توبـولین، گونـه‌هـای *C. acutatum*، *C. acutatum* f. sp. *hakeae*، *C. boninense*، *C. crassipes* و *C. gloeosporioides* را از گونه‌های مختلف تیره پروتیاسه شناسایی نمودنـد. هـدف ایـن تحقیـق بررسـی و شناسـایی گونه‌های *Colletotrichum* روی برخی گیاهان زراعی تیـره لگومینـوز بـا اسـتفاده از روش‌هـای مورفولوژیکی و مولکولی بود.

روش بررسی

جمع‌آوری و جداسازی جدایه‌های *Colletotrichum*: نمونه‌های گیـاهی آلـوده، از مـزارع

یونجه، شبدر، لوبیا و سویا از استان‌های همدان، لرستان و استان گیلان جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده به طور جداگانه در پاکت‌های کاغذی قرار داده شدند و سپس به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۴ درجه سانتیگراد در یخچال نگهداری گردیدند. برای جداسازی جدایه‌های *Colletotrichum* بافت‌های گیاهی، با اسکالپل سترون به قطعات کوچک به اندازه پنج میلیمتر مربع بریده شدند (طوری که در هر قطعه، هم بافت آلوده و هم بافت سالم وجود داشته باشد). سپس قطعات بسته به ضخامت بافت گیاهی، با محلول هیپوکلریت سدیم ۱ ٪ به مدت ۱ الی ۱/۵ دقیقه ضدعفونی و سپس دو بار با آب مقطر سترون کاملاً شستشو داده شدند. نمونه‌ها روی کاغذ صافی خشک شده و به محیط کشت سیب‌زمینی- دکستروز- آگار (PDA) منتقل شدند و در انکوباتور در دمای ۲۸- ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند. پرگنه قارچ‌های جدا شده از بافت‌های گیاهی، معمولاً بعد از ۲۴ ساعت به صورت ماکروسکوپی قابل رویت بودند. قارچ‌های جدا شده هر روز از نظر خصوصیات ریخت‌شناختی (رنگ پرگنه، وجود یا عدم وجود اپرسوریوم و شکل و اندازه کنیدیوم و اپرسوریوم) مورد بررسی قرار گرفتند و خصوصیات آن‌ها با شرح جنس *Colletotrichum* (Sutton, 1980) مقایسه شد و پس از شناسایی در حد جنس، بخشی از حاشیه پرگنه آن که دارای ریسه‌های تازه و سریع‌الرشد بود، با سوزن سترون به تشتک پتری جدید محتوی محیط کشت سیب‌زمینی- دکستروز- آگار منتقل گردید و برای بررسی‌های بیشتر، در دمای ۲۸- ۲۵ درجه سانتیگراد و در تاریکی، در انکوباتور نگهداری شد. برای خالص‌سازی جدایه‌ها از روش تک اسپور کردن استفاده شد. جدایه‌های تک اسپور شده برای نگهداری طولانی‌تر و مطالعات بعدی، به لوله‌های آزمایش محتوی محیط کشت شیب‌دار سیب‌زمینی- دکستروز- آگار منتقل شدند و بعد از رشد کردن در شرایط ذکر شده در بالا، در دمای ۴ درجه سانتیگراد در یخچال نگهداری گردیدند و هر بار برای بررسی‌های جدید از آن‌ها کشت تازه تهیه شد. برای شناسایی جدایه‌های *Colletotrichum* در این تحقیق از کلید ارائه شده توسط Sutton (1980) و شرح گونه‌های پذیرفته شده *Colletotrichum* (Sutton, 1992) استفاده شد. برای بررسی ویژگی‌های میکروسکوپی (اندازه و شکل کنیدیوم‌ها و موها)، جدایه‌ها روی محیط کشت سیب‌زمینی- هویج- آگار (۲۰ گرم هویج، ۲۰ گرم سیب‌زمینی به علاوه ۲۰ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر)

کشت داده شدند و به مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، در ۱۲ ساعت روشنایی/ ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. بعد از یک هفته از جدایه‌های رشد کرده اسلاید تهیه شد. با استفاده از اسلایدهای تهیه شده، شکل کنیدیوم، کنیدیوفور، سلول‌های کنیدیوم‌زا و موهای هر جدایه به کمک میکروسکوپ نوری مجهز به لوله ترسیم رسم گردید و ۴۰ کنیدیوم از هر کدام از جدایه‌ها به صورت تصادفی انتخاب و طول و عرض آن‌ها به کمک میکروسکوپ نوری مجهز به لنز مدرج اندازه‌گیری شد. برای مشاهده اپرسوریوم جدایه‌ها، از روش کشت اسلاید Sivan & Chet (1989) استفاده شد. ۴۰ اپرسوریوم در هر جدایه به صورت تصادفی انتخاب و طول و عرض آن‌ها به کمک میکروسکوپ نوری مجهز به لنز مدرج اندازه‌گیری گردید. برای مشاهده و اندازه‌گیری طول و عرض اپرسوریوم‌ها و کنیدیوم‌ها، از میکروسکوپ نوری مدل لایکا، مجهز به لنز مدرج و سیستم فاز کنتراست و برای رسم شکل اندام‌های قارچی (کنیدیوم، اپرسوریوم، کنیدیوفور، سلول‌های کنیدیوم‌زا و مو) از میکروسکوپ نوری مدل لایتز، مجهز به لوله ترسیم استفاده شد.

استخراج DNA ژنومی و تعیین توالی نواحی ITS: استخراج DNA بر اساس روش Lee & Taylor (1990) انجام شد. از آغازگرهای ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') برای تکثیر نواحی ITS استفاده شد. قطعات DNA تکثیر شده با استفاده از کیت خالص‌سازی QIAquick PCR خالص شدند. تعیین توالی DNA نمونه‌ها با استفاده از Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (ABI 0401041) و دستگاه ABI 3100 DNA sequencer در انستیتوی ملی بیوتکنولوژی کشاورزی کره جنوبی انجام شد.

تجزیه و تحلیل توالی نواحی ITS: هفت جدایه از گونه‌های مختلف *Colletotrichum* و *Glomerella* بعد از این که با روش‌های مبتنی بر خصوصیات ریخت‌شناختی غربال شدند، برای انجام تحقیقات مولکولی و شناسایی دقیق انتخاب گردیدند و نواحی ITS1، ITS2 و ژن 5.8S آن‌ها تعیین توالی شد. توالی نواحی ITS1، ITS2 و ژن 5.8S تعدادی از گونه‌های *Colletotrichum* و *Glomerella* (به ویژه جدایه‌های X-type) نیز از بانک ژن دریافت شدند و همراه توالی جدایه‌های ایران، در بررسی‌های مقایسه‌ای به کار رفتند (جدول ۲). برای همردیف

کردن توالی‌ها از نرم‌افزار GeneDoc نسخه ۲ استفاده شد. توالی‌ها هم به صورت خودکار و هم به صورت دستی همردیف شدند و بعد بخش‌های همردیف نشده غیرمعمول حذف گردیدند. برای رسم درخت فیلوژنتیک، از نرم‌افزار TreeCon استفاده شد و درخت فیلوژنتیک با روش NJ و مدل دو پارامتری کیمورا با هزار bootstrap رسم گردید. در ضمن با توجه به مقالات مختلف در زمینه بررسی‌های تاکسونومیک گونه‌های مختلف *Colletotrichum*، توالی جدایه Gongzhuling 01 قارچ *Magnaporthe grisea* به عنوان outgroup استفاده گردید.

نتیجه و بحث

در این تحقیق در مجموع ۱۴ جدایه *Colletotrichum* و یک جدایه *Glomerella* از گیاهان آلوده به دست آمد (جدول ۱). جدایه‌های *Colletotrichum* بر اساس بررسی‌های مورفولوژیکی به طور مقدماتی مورد شناسایی قرار گرفته و هفت جدایه آنها برای مطالعات مولکولی غربال شدند. این جدایه‌های با تعدادی از جدایه‌های *Colletotrichum* و *Glomerella* که از بانک ژن دریافت شده بودند (جدول ۲) در بررسی‌های مقایسه‌ای به کار رفتند. به کمک مطالعات ریخت‌شناسی و نتایج به دست آمده از تعیین توالی نواحی ITS1, ITS2 و ژن 5.8S (شکل ۶) گونه‌های *C. acutatum* و *C. dematium* از لوبیا، *C. destructivum* از یونجه و شبدر، *C. truncatum* از یونجه و *Glomerella cingulata* از سویا شناسایی شدند. از بین آن‌ها *C. acutatum* و *C. destructivum* برای فلور قارچ‌های ایران جدید هستند و برای اولین بار *C. dematium* روی لوبیا و *G. cingulata* روی سویا در ایران و *C. truncatum* روی یونجه در استان همدان از این میزبان‌ها گزارش می‌شوند که هر یک از آنها به شرح زیر تشریح می‌گردند.

Colletotrichum acutatum J. H. Simmonds ex Simmonds, Queesland. J. Agric. Anim. Sci. 25: 178 (1968), (شکل ۱).

پرگنه روی محیط سیب‌زمینی- دکستروز- آگار در ابتدا سفید رنگ و بعد به رنگ خاکستری تا خاکستری مایل به قهوه‌ای درمی‌آید. سطح زیرین پرگنه خاکستری تیره یا سیاه رنگ است ولی Sutton, (1992) گزارش داده است که پشت پرگنه در برخی از جدایه‌ها ممکن است صورتی تا زرشکی باشد که این حالت در جدایه‌های به دست آمده در این بررسی دیده

جدول ۱- فهرست گونه‌های *Colletotrichum* و گونه *G. cingulata* جدا شده از مناطق مختلف ایران

Table1- *Colletotrichum* species and *Glomerella cingulata* isolated from different places of Iran

گونه **Species**	شماره دسترسی **Accession no.**	تعداد جدایه **Isolate no.**	میزبان **Host**	محل و تاریخ جمع‌آوری **Place and date of colection**
Colletotrichum truncatum	FJ185792	2	Alfalfa	نهاوند (استان همدان) تابستان ۱۳۸۴ Nahavand (Hamedan) Summer 2005
Colletotrichum dematium	FJ185787	2	Bean	آورزمان (استان همدان) تابستان ۱۳۸۴ Avarzeman (Hamedan) Summer 2005
Colletotrichum destructivum	FJ185788	1	Alfalfa	بروجرد (استان لرستان) تابستان ۱۳۸۴ Boroujerd (Lorestan) Summer 2005
Colletotrichum destructivum	FJ185789	3	Clover	همدان (استان همدان) تابستان ۱۳۸۴ Hamedan (Hamedan) Summer 2005
Colletotrichum truncatum	FJ185791	2	Alfalfa	الشتر (استان لرستان) تابستان ۱۳۸۴ Aleshtar (Lorestan) Summer 2005
Glomerella cingulata	FJ185790	1	Soybean	رشت (استان گیلان) تابستان ۱۳۸۴ Rasht (Gilan) Summer 2005
Colletotrichum acutatum	FJ185786	3	Bean	کلاچای (استان گیلان) تابستان ۱۳۸۴ Kalachai (Gilan) Summer 2005

جدول ۲- فهرست گونه‌های *Colletotrichum* و گونه *G. cingulata* که نواحی ITS1, ITS2 و ژن 5.8S آنها از بانک ژن دریافت شد

Table 2- Charactrization of *Colletotrichum* species and *Glomerella cingulata* That their ITS1,ITS2 and 5.8S sequences were retrieved from gene bank

گونه Species	شماره دسترسی Accession no.	منبع References	سال Year
C. acutatum	AJ749676	Talhinhas *et al.*	2005
C. acutatum	AJ749687	Talhinhas *et al.*	2005
C. dematium	AY376531	Lubbe *et al.*	2005
C. dematium	AB046608	Moriwaki *et al.*	2005
C. destructivum	AB105959	Moriwaki *et al.*	چاپ نشده
C. destructivum	AJ558107	O'Connell *et al.*	چاپ نشده
C. truncatum	DQ195713	Lam *et al.*	چاپ نشده
G. cingulata	AY566308	Spinoza-Ortega *et al.*	چاپ نشده

نشد. این گونه اسکلروت تشکیل نمی‌دهد. اپرسوریوم‌ها قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره، چماقی، تخم‌مرغی تا واژتخم‌مرغی می‌باشند و گاهی اوقات شکل آن‌ها نامنظم است و حاشیه‌های صاف تا کمی لب‌دار دارند. اپرسوریوم‌ها به صورت تکی و گاهی اوقات به صورت مجموعه‌ای از اپرسوریوم‌های چسبیده به هم تشکیل می‌شوند. اندازه اپرسوریوم‌ها ۵/۳-۴ × ۱۰/۵-۸/۵ میکرومتر است. کنیدیوم‌ها در توده‌های صورتی تا نارنجی یا قرمز رنگ تشکیل می‌شوند و مستقیم و دوکی‌شکل هستند. نوک کنیدیوم‌ها در هر دو طرف باریک می‌شود و گاهی اوقات در قسمت وسط فرورفته هستند. اندازه آن‌ها ۴/۵-۳/۵ × ۱۵-۱۰/۵ (۹) میکرومتر است. خصوصیات اصلی که باعث تمایز *C. acutatum* از بقیه گونه‌های *Colletotrichum* می‌شود، کنیدیوم‌های غالباً بیضوی و دوکی آن و رشد کندتر آن در محیط کشت است که این ویژگی توسط Sreenivasaprasad & Talhinhas (2005) نیز مشاهده شده است. در اکثر موارد، این قارچ از نظر ریخت‌شناسی به دو تیپ خاکستری و صورتی تقسیم شده است و مطالعات نشان می‌دهند که ویژگی‌های ریخت‌شناسی اسپور در جدایه‌های متعلق به تیپ خاکستری متنوع‌تر از جدایه‌های تیپ صورتی است (Vinnere, 2004). در این بررسی گونه *C. acutatum* از لوبیا که از منطقه کلاچای در استان گیلان جمع‌آوری شده بود، با توجه به خصوصیات ریخت‌شناختی جزء تیپ خاکستری *C. acutatum* است و توده‌های کنیدیومی نارنجی رنگ تولید می‌کند. این گونه دارای دامنه میزبانی بسیار وسیعی است. بادام، سیب، مرکبات، لوپن (لوبیای گرگی)، زیتون، هلو، کاج، توت‌فرنگی و شقایق نعمانی از میزبان‌های مهم این گونه محسوب می‌شوند (Bailey & Jeger, 1992). *C. acutatum* قادر به ایجاد بیماری در اندام‌های مختلف گیاه شامل ریشه، سرشاخه، برگ، گل و میوه است و باعث ایجاد علائم مختلفی مانند پوسیدگی ریشه، ریزش برگ، سوختگی گل و پوسیدگی میوه می‌شود (Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004). علائم ایجاد شده توسط این گونه روی لوبیا، روی غلاف میوه مشاهده شد و شامل زخم‌های فرورفته و کروی بود که توده‌های اسپور نارنجی رنگ به صورت دوایر متحدالمرکز همراه با میسلیوم‌های سفید روی آن‌ها تشکیل شده بود. آلودگی در برخی از غلاف‌ها به حدی بود که زخم‌ها غلاف را به طور کامل پوشانده بودند. به طوریکه در شکل ۶ ملاحظه می‌شود این جدایه در مجموع با کمک بررسی‌های مورفولوژیکی

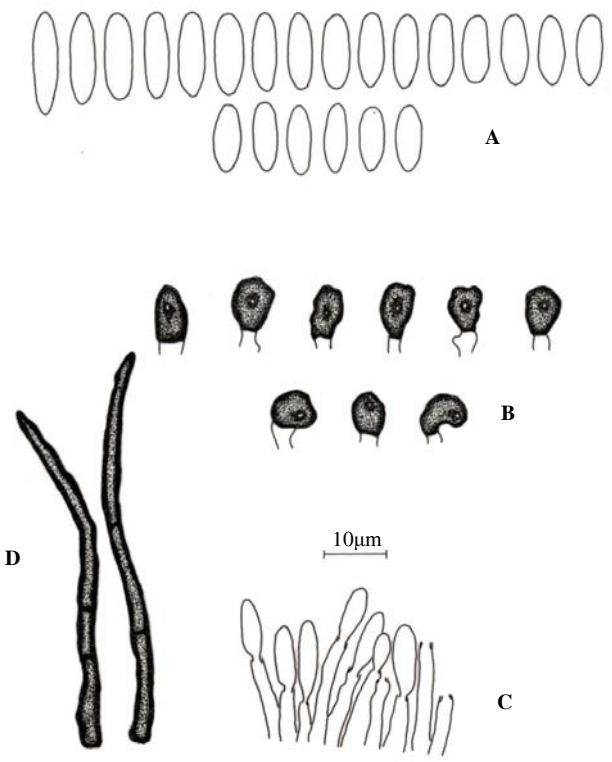
و مولکولی *C. acutatum* شناسایی شد. این گونه برای فلور قارچی ایران جدید است.

Colletotrichum dematium (Pers. ex Fr.) Grove, J. Bot., London. 56: 341 (1918), (شکل ۲).

پرگنه این گونه بسیار متغیر و دارای رنگ‌های بسیار مختلفی از سفید، خاکستری روشن تا قهوه‌ای می‌باشد. بخش‌هایی از پرگنه ممکن است به رنگ خاکستری مایل به ارغوانی درآید که این موضوع توسط Baxter *et al*. (1983) نیز ملاحظه گردیده است. پشت پرگنه معمولاً قهوه‌ای تیره است. موها و اسکلروت‌ها به فراوانی تشکیل می‌شوند. اسکلروت‌ها سیاه رنگ و مخروطی هستند. اپرسوریوم‌ها قهوه‌ای رنگ، گرزی‌شکل، تخم‌مرغی تا نامنظم هستند و حاشیه‌های صاف یا کمی لب‌دار دارند. اندازه اپرسوریوم‌ها (۱۷–) ۱۱–۶ × (۲۹–) ۱۹–۱۰ میکرومتر است. کنیدیوم‌ها در توده‌های کرمی، خاکستری مایل به زیتونی تا ارغوانی روشن تشکیل می‌شوند و داسی شکل یا دوکی هستند و به تدریج در دو انتها باریک می‌شوند. اندازه آن‌ها ۳/۳–۲/۵ × (۲۹–) ۲۵–۱۷ (۱۴) میکرومتر است. این گونه از دامنه وسیعی از گیاهان شامل ۱۱۸ جنس مختلف و از ۳۷ کشور جهان گزارش شده است (Sutton, 1980). در این بررسی این گونه از لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) از روستای آورزمان نهاوند در استان همدان جدا شد. علائم روی غلاف لوبیا به صورت لکه‌های قهوه‌ای رنگ نکروزه بودند و بافت غلاف در این قسمت‌ها کاملاً از بین رفته بود. برخلاف علائم ایجاد شده توسط *C. acutatum* روی لوبیا، در این‌جا هیچ اثری از کنیدیوم‌ها یا میسلیوم‌های قارچ دیده نشد. به طوریکه در شکل ۶ ملاحظه می‌شود این جدایه در مجموع با کمک بررسی‌های مورفولوژیکی و مولکولی *C. dematium* شناسایی شد. این گونه قبلاً از ایران روی زنبق گزارش شده است (Magnus, 1900) و این اولین گزارش از وجود آن روی لوبیا در ایران می‌باشد.

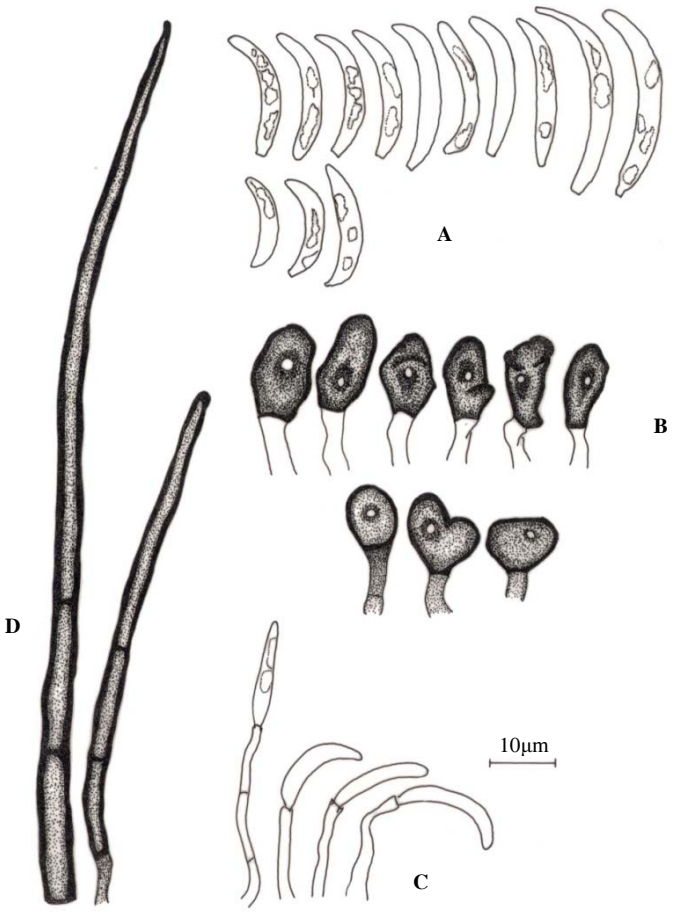
Colletotrichum destructivum O'Gara., Mycolgia. 7: 38 (1915), (شکل ۳).

پرگنه خمیری و فشرده است. رنگ پرگنه در مرکز زرد پرتقالی تا زرد تیره یا صورتی مایل به قهوه‌ای است. میسلیوم‌ها در حاشیه پرگنه کمی فشرده‌اند و حالت آردی دارند و بی‌رنگ تا قهوه‌ای مایل به قرمز کم‌رنگ می‌باشند. رنگ پرگنه برخی از جدایه‌ها بعد از مدتی کاملاً سیاه رنگ می‌شود. موها پراکنده هستند. اسکلروت‌ها گاهی اوقات تشکیل می‌شوند و پراکنده،



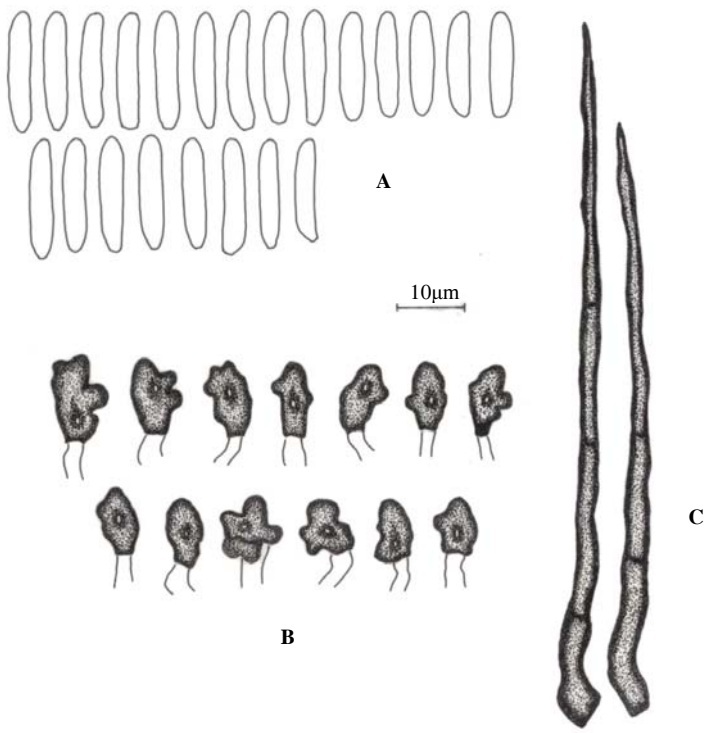
شکل ۱– *Colletotrichum acutatum*: a: کنیدیوم‌ها، b: اپرسوریوم‌ها، c: سلول‌های کنیدیوم‌زا، d: موها

Fig. 1- *Colletotrichum acutatum*: a: Conidia b: Appresoria c: conidiophores and conidiogenous cells d: Setae



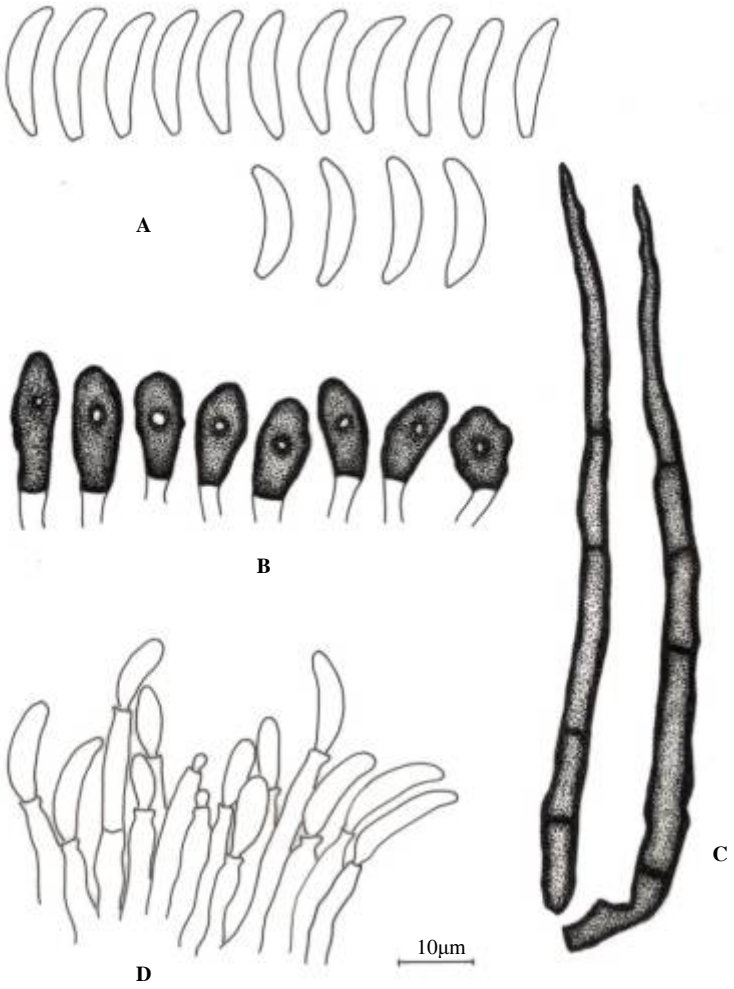
شکل ۲– *Colletotrichum dematium*: a: کنیدیوم‌ها، b: اپرسوریوم‌ها، c: شکل کنیدیوفورها و d: موها

Fig. 2- *Colletotrichum dematium*: a: Conidia, b: Appresoria c: conidiophores and conidiogenous cells, d: Setae



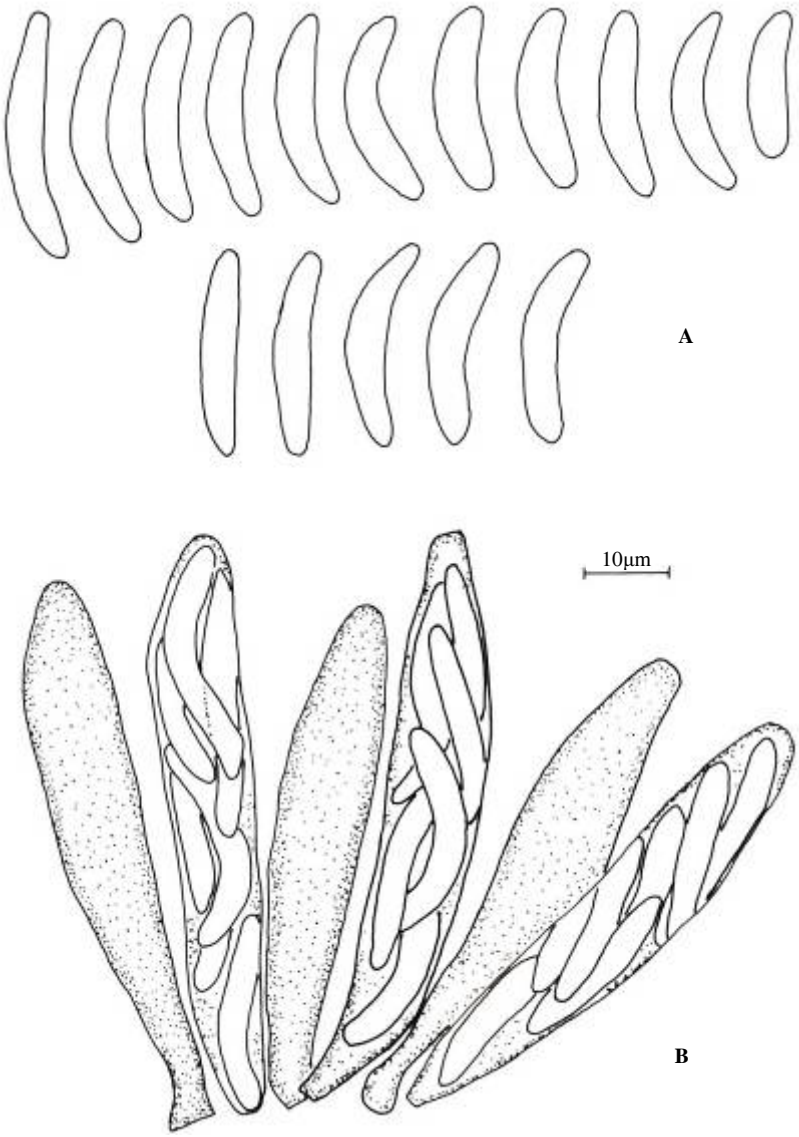
شکل ۳- *Colletotrichum destructivum*: a: کنیدیوم‌ها، b: اپرسوریوم‌ها، c: موها

Fig. 3- *Colletotrichum destructivum*: a: Conidia, b: Appresoria, c: Setae



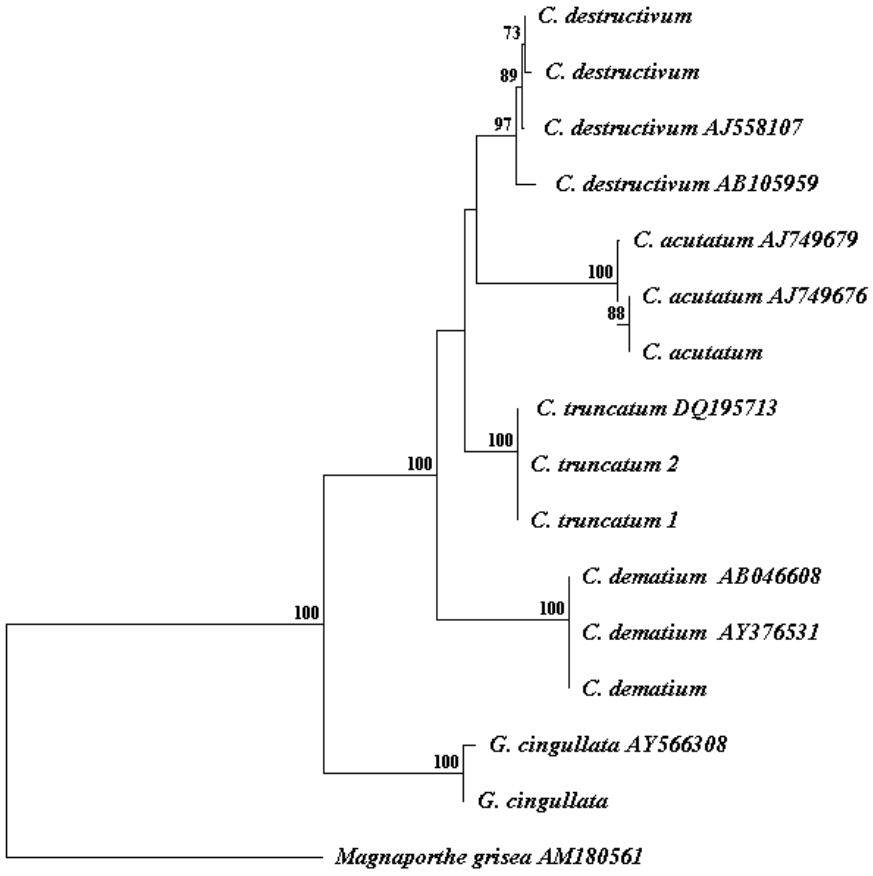
شکل ۴- *Colletotrichum truncatum*: a: کنیدیوم‌ها، b: اپرسوریوم‌ها، c: موها و d: کنیدیوفورها و سلول‌های کنیدیوم‌زا

Fig. 4- *Colletotrichum truncatum*: a: Conidia, b: Appresoria, c: Setae, d: conidiophores and conidiogenous cells



شکل ۵– *Glomerella cingulata*: a: آسکوسپورها، b: آسک‌ها

Fig. 5- *Glomerella cingulata*: a: ascospores b: Asci



شکل ۶- درخت neighbor-joining، حاصل از تعیین توالی نواحی ITS1، ITS2 و ژن 5.8S جدایه‌های *Colletotrichum* با استفاده از نرم افزار TreeCon با هزار تکرار Bootstrap

Fig. 6- *Colletotrichum* . neighbor-joining tree obtained from sequences of ITS1, ITS2 and 5.8S using TreeCon with 1000 bootstrap

فرورفته، کروی، نیم‌کروی یا بدون شکل منظم هستند. اپرسوریوم‌ها به فراوانی تشکیل می‌شوند و گرزی، تخم‌مرغی یا نامنظم هستند. اپرسوریوم‌ها (۱۲–) ۱۰–۶ (۴/۵) × (۱۴/۵–) ۱۳–۷ (۴) میکرومتر هستند. کنیدیوم‌ها در توده‌های نارنجی رنگ یا درون میسلیوم تشکیل می‌شوند و مستقیم یا کمی خمیده هستند که یکباره در نوک باریک می‌شوند. نوک کنیدیوم‌ها گرد و انتهای آن‌ها مسطح است و اندازه آن‌ها ۴–۳ × ۱۸/۵–۱۴/۵ میکرومتر می‌باشد. *C. destructivum* دارای دامنه میزبانی نسبتاً وسیعی است و به اعضای تیره لگومینوز مانند لوبیا چشم‌بلبلی، یونجه و سویا (Lenné, 1992)، تیره *Solanaceae* (Abdul Wajid & Elias, 1988) و توتون (Shen *et al*., 2001) حمله می‌کند. در این بررسی جدایه‌های *C. destructivum* روی یونجه از بروجرد و روی شبدر از همدان جداسازی شد. علائم بیماری روی برگ‌های این دو گیاه به صورت زخم‌های گرد و کوچک به رنگ قهوه‌ای در بافت مرده و کاغذی برگ مشاهده شد. به طوریکه در شکل ۶ ملاحظه می‌شود این جدایه‌ها در مجموع با کمک بررسی‌های مورفولوژیکی و مولکولی *C. destructivum* شناسایی شدند. این گونه برای فلور قارچی ایران جدید می‌باشد.

Colletotrichum truncatum (Schwein.) Andrus & W. D. Moore, Phytopathology. 25: 121 (1935), (شکل ۴).

پرگنه پنبه‌ای تا کرکی یا مسطح و رنگ آن خاکستری روشن تا تیره یا سیاه است. حاشیه پرگنه‌ها صاف تا نامنظم است و ممکن است فرورفته تا کمی مسطح باشد. موها پراکنده‌اند و اسکلروت‌ها در کل پرگنه پخش هستند و داخل آن فرورفته‌اند. شکل آن‌ها نامنظم است و گاهی اوقات مجتمع می‌شوند. اپرسوریوم‌ها به فراوانی تشکیل می‌شوند. اپرسوریوم‌ها گرزی‌شکل یا شکل نامنظم دارند. اندازه آن‌ها ۹/۵–۶/۵ × (۲۱–) ۱۹–۱۳ (۱۰/۵) میکرومتر است. کنیدیوم‌ها در توده‌های زعفرانی تا نارنجی رنگ تشکیل می‌شوند، داسی شکل هستند ولی خمیدگی آن‌ها زیاد نیست. کنیدیوم‌ها به تدریج به سمت نوک باریک می‌شوند ولی ضخامت آن‌ها در پایه به طور ناگهانی کم می‌شود. اندازه آن‌ها ۴–۳ × (۱۹–) ۱۷/۲–۱۵/۵ (۱۴/۵) میکرومتر است. در این بررسی گونه *C. truncatum* از یونجه‌های آلوده جمع‌آوری شده از شهرهای نهاوند، الشتر و بروجرد جداسازی و شناسایی شد. این گونه باعث ایجاد آنتراکنوز

در ساقه‌های یونجه می‌شود که علائم آن به صورت زخم‌های فرورفته قهوه‌ای تا سیاه رنگی است که ممکن است رشد کنند و دور تا دور ساقه را بگیرند و کل ساقه را از بین ببرند. به طوریکه در شکل ۶ ملاحظه می‌شود این جدایه‌های در مجموع با کمک بررسی‌های مورفولوژیکی و مولکولی *C. truncatum* شناسایی شدند. این گونه قبلاً روی یونجه از ایران در استان زنجان گزارش شده است (Naseri, 2002). وجود این قارچ روی یونجه در استان همدان (از مراکز اصلی تولید این محصول) جدید می‌باشد.

Glomerella cingulata (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk, in Schrenk & Spaulding, Science, N.S. 17: 751 (1903), (شکل ۵) .

این قارچ از سویا جدا شد و فقط مرحله تلئومورفی آن در تشتک پتری تشکیل گردید. پرگنه این جدایه صورتی کم رنگ است و بعد از مدتی بخش‌هایی از پرگنه به رنگ خاکستری درمی‌آید. پریتسیوم‌هایی به رنگ قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره در سطح پرگنه به وجود می‌آیند که تولید آن‌ها از مرکز پرگنه به سمت حاشیه‌ها است و به صورت مجتمع تشکیل می‌شوند. پریتسیوم‌ها گردن کوتاه دارند و آسک‌ها در آن‌ها تشکیل می‌شوند. آسک‌ها در این جدایه تک جداره‌ای، کشیده و گرزی‌شکل و بی‌رنگ تا کمی زرد رنگ هستند و ممکن است دارای پایه کوتاه یا بدون پایه باشند. اندازه آن‌ها ۱۲–۹ × ۷۱/۵–۴۹/۵ میکرومتر است. آسکوسپورها بی‌رنگ تا قهوه‌ای روشن و کشیده هستند و هر دو انتهای آن‌ها گرد است. آسکوسپورها به تعداد ۸ یا ۶ عدد در دو ردیف درون آسک‌ها تشکیل می‌شوند. اندازه آن‌ها ۵/۵–۳/۵ × ۲۵–۱۷ میکرومتر می‌باشد. به طوریکه در شکل ۶ ملاحظه می‌شود این جدایه در مجموع با کمک بررسی‌های مورفولوژیکی و مولکولی *G .cingulata* شناسایی شد. این گونه قبلاً از ایران روی *Populus nigra*، *Magnifera indica*، *Euonymus japonicas* و *Citrus aurantium* گزارش شده است (Scharif & Ershad, 1966). در این بررسی این قارچ برای اولین بار از سویا در ایران گزارش می‌شود*.

* **نشانی نگارندگان:** دکتر دوستمراد ظفری و مهندس ساره طراح همدانی، دانشگاه بوعلی سینا- همدان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی، همدان، ایران.

منابع

ABDUL WAJID, S. M. and N. A. ELIAS, 1988. Collateral hosts of *Colletotrichum tabacum*. Tobacco Research. 14: 74-75.

BAILEY, A. J. and M. J. JEGER, 1992. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. CAB International. 388 pp.

BAILEY, J. A., C. NASH, L.W. MORGAN, R. J. O'CONNELL and D. O. TEBEEST, 1996. Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing anthracnose on the Malvaceae. Phytopathology. 86: 1076-1083.

BAXTER, A. P., G. C. A. VAN DER WESTHUIZEN and A. EICKER, 1983. Morphology and taxonomy of South African isolates of *Colletotrichum*. South African Journal of Botany 2: 259-289

HASSAN ZADEH KHALIFAH KANDI, Z. 2004. Identification of plant parasitic nemathods belonging to order *Tylenchida* in alfalfa fields in Hamedan province and determination of their distribution. Msc. thesis, Bu-Ali Sina University.

HOWARD, C. M., J. L. MAAS, C. K. CHANDLER and E. F. ALBREGTS, 1992. Anthracnose of strawberry caused by *Colletotrichum* complex in Florida. Plant Disease. 76: 976-981.

HYMOVITZ, T. 1987. Introduction of the soybean to Illinois. Econ. Bot. 41: 28-32.

JEFFRIES, P., J. C. DODD, M. J. JEGER, and R. A. PLUMBLEY, 1990. The biology of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. Plant Pathology. 39: 343-366.

JOHNSON, D. A., L. M. CARRIS and J. D. ROGERS, 1997. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* nym*p*haeae and *Colletotrichum nupharicola* sp. nov. on water-lilis (*Nymphaea* and *Nuphar*). Mycological Research. 101: 641-649.

LATUNDE-DADA, A. O. 2001. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. Molecular Plant Pathology. 2: 187-198.

LATUNDE-DADA, A. O., R. J. O'CONNELL, C. NASH, R. J. PRING, J. R. LUCAS and J. A. BAILEY, 1996. Infection process and identity of hemibiotrophic anthracnose fungus *Colletotrichum destructivum* O'Gara from cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Mycological Research. 100: 1133-1141.

LEE, S. B. and J. W. TAYLOR, 1990 Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. (eds.). PCR

protocols, A guide to methods and applications. San Diego Academic Press. pp. 282-287.

LENNÉ, J. M. 1992. *Colletotrichum* diseases of legumes. pp. 134-166. In: Bailey J.A. and Jeger M.J. (eds.). *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. CAB International.

LUBBE, C. M., S. DENMAN, P. F. CANNON, J. Z. GROENEWALD, S. C. LAMPRECHT, and P. W. CROUS, 2004. Characterization of *Colletotrichum* species associated with diseases of Proteaceae. Mycologia. 96: 1268-1279.

MAGNUS, P. 1900. Fungi Weiterer Beitrag zur Kenntinis der Pilze des Orients. Verh. K. K. Zool-Bot. Gesellsch. 50: 432-449.

MILLS, P. R., A. HODSON and A. E. BROWN, 1992. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruits pp. 269-288. In: BAILEY J.A. and JEGER M.J. (eds.).*Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. CAB International.

MORGAN, O. D. 1956. Host range on tobacco anthracnose caused by a species of *Colletotrichum*. Plant Disease Reporter. 40: 915-980.

MORIWAKI, J., T. TSUKIBOSHI and T. SATO, 2002. Grouping of *Colletotrichum* Species in Japan based on rDNA sequences. Journal of Genetic Plant Pathology. 68: 307-320.

NASERI, B. 2002. Introducing *Colletotrichum truncatum* as a causal agent of alfalfa anthrachnose in Zanjan province. 15th Iranian Plant Protection Congress, Kermanshah, p. 54.

SCHARIF, G. and D. ERSHAD, 1966. A list of fungi on cultivated plants, shrubs and trees of Iran. Ministry of Agriculture, Plant Pests and Diseases Research Institute.

SHEN, S., P. GOODWIN and T. HSIANG, 2001. Hemibiotrophic infection and identity of the fungus, *Colletotrichum destructivum* causing anthracnose of tobacco". Mycological research. 105: 1340-1347.

SHERRIF, C., M. J. WHELAN, G. M. ARNOLD and J. A. BAILEY, 1995. rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum graminicola* and *C. sublineolum*. Mycological Research. 99: 475-478.

SHERRIF, C., M. J. WHELAN, G. M. ARNOLD, J. F. LAFAY, Y. BRYGOO and J. A. BAILEY, 1994. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. Exp. Mycol. 18: 121-138.

SIVAN, A. and I. CHET, 1989. The possible role of competition between *Trichoderma*

harzianum and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization". Phytopathology. 79: 198.

SREENIVASAPRASAD, S. and P. TALHINHAS, 2005. Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. Molecular Plant Pathology. 6: 361-378.

SUTTON, B. C. 1980. The Coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute. 696 pp.

SUTTON, B. C. 1992. The Genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. pp. 1-23. In: BAILEY J. A. and JEGER M. J. (eds.)."*Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. CAB International.

VINNERE, O. 2004. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. Ph.D. thesis. University of Uppsala. Sweden.

WALLER, J. M. 1992. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. In: BAILEY J. A. and JEGER M.J. (eds.).*Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. CAB International. pp. 167-185.

WHARTON, P. S. and J. DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. Anales. Jard. Bot. Madrid. 61: 3-22.

ZAD, J. 1979. Mycoflora of soybean seeds. Iranian Journal of Plant Pathology. 15: 42-47.

Address of the authors: Dr. D. ZAFARI and Eng. S. TARAH HAMADANI, Department of plant protection, Faculty of Agriculture, Buali Sina University, Hamadan, Iran.